

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/BR05/000008

International filing date: 21 January 2005 (21.01.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: BR
Number: PI0400246-6
Filing date: 22 January 2004 (22.01.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 24 March 2005 (24.03.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

PCT/BR 2005/000008



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
Ministério do Desenvolvimento, da Indústria e Comércio Exterior.
Instituto Nacional da Propriedade Industrial
Diretoria de Patentes

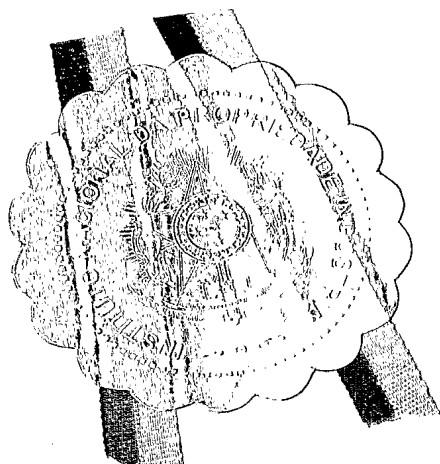
CÓPIA OFICIAL

PARA EFEITO DE REIVINDICAÇÃO DE PRIORIDADE

O documento anexo é a cópia fiel de um
Pedido de Patente de Invenção.
Regularmente depositado no Instituto
Nacional da Propriedade Industrial, sob
Número PI 0400246-6 de 22/01/2004.

Rio de Janeiro, 28 de Fevereiro de 2005.

A stylized, handwritten signature in black ink, appearing to read "Bueno".
Oscar Paulo Bueno
Chefe do Nucad
Mat: 0449117



Protocolo JN 1431 - 000276

Número (21)

DEPÓSITO

Pedido de Patente ou de
Certificado de Adição



PI0400246-6

depósito / /

(número e data de depósito)

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome:

FUNDAÇÃO DE ESTUDOS AGRÁRIOS "LUIZ DE QUEIROZ" – FEALQ – Empresa Brasileira

1.2 CGC/CPF (se houver): 48.659.502/0001-55

1.3 Endereço completo:

Avenida Centenário, 1080 - Piracicaba - SP

1.4 Telefone: ()
FAX: ()

(X) continua em folha anexa

2. Natureza:

(X) 2.1 Invenção () 2.1.1. Certificado de Adição () 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e por extenso, a Natureza Desejada: PATENTE DE INVENÇÃO

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

"CASSETE DE EXPRESSÃO DE GENES, USO DE UM OU MAIS CASSETES DE EXPRESSÃO DE GENES, MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM CÉLULAS VEGETAIS, MÉTODO DE OBTENÇÃO DE PLANTA GENETICAMENTE MODIFICADA, PLANTAS GENETICAMENTE MODIFICADAS, USO DA PLANTA, PLANTAS DERIVADAS, SEMENTES GENETICAMENTE MODIFICADAS, USO DA SEMENTE GENETICAMENTE MODIFICADA, ..." (X) continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão do Pedido n.º _____, de ____ / ____

5. Prioridade Interna - O depositante reivindica a seguinte prioridade:

N.º de depósito _____ Data de Depósito _____ (66)

6. Prioridade - o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

País ou organização de origem	Número do depósito	Data do depósito

() continua em folha anexa

7. **Inventor (72):**
 Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
 (art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo n.º 127/97)
- 7.1 Nome e CPF:
 (1) Carlos Alberto Labate – brasileiro, professor universitário, lotado no Departamento de Genética ESALQ-USP
 (2) Mônica Teresa V. Labate – brasileira, pós-doutora, lotada no Departamento de Genética ESALQ-USP
 (3) Ana Letícia Bertolo – brasileira, aluna de doutorado, lotada no Departamento de Genética ESALQ-USP
- 7.2 Endereço:
 (1) Av. Pádua Dias, 11 – 13400-970 – Piracicaba – SP
 (2) Av. Pádua Dias, 11 – 13400-970 – Piracicaba – SP
 (3) Av. Pádua Dias, 11 – 13400-970 – Piracicaba – SP
- 7.3 CEP: 7.4 Telefone: ()
- (X) continua em folha anexa

8. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo n.º 127/97

() em anexo

9. Declaração de divulgação anterior não prejudicial (Período de graça):
 (art. 12 da LPI e item 2 do Ato Normativo n.º 127/97):

() em anexo

10. **Procurador (74):**
 10.1 Nome e CPF/CGC:
LUCAS MARTINS GAIARSA, brasileiro, casado, engenheiro, advogado
API 901
- 10.2 Endereço:
Av. Brigadeiro Faria Lima, 1485 - 12º andar – São Paulo – SP
- 10.3 CEP: 01451-904 10.4 Telefone: (011) 38.19.45.45

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
 (Deverá ser indicado o n.º total de somente uma das vias de cada documento)

X	11.1 Guia de recolhimento	01 fls.	X	11.5 Relatório descritivo	26 fls.
X	11.2 Procuração	07 fls.	X	11.6 Reivindicações	05 fls.
	11.3 Documentos de prioridade	fls.	X	11.7 Desenhos	01 fls.
	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	X	11.8 Resumo	01 fls.
X	11.9 Outros (especificar): Esclarecimento				01 fls.
X	11.10 Total de folhas anexadas:				42 fls.

12. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

São Paulo, 22/01/2004

Local e Data


 Lucas Martins Gaiarsa
 API 901

ANEXO DOS DEPOSITANTES

1. **Depositante (71):**

1.1 Nome:

COMPANHIA SUZANO DE PAPEL E CELULOSE – Empresa Brasileira

1.2 CGC/CPF (se houver): **60.651.726/0001-16**

1.3 Endereço completo:

Av. Brigadeiro Faria Lima, 1.355 – 5º ao 10º andares – 01452-919 – Pinheiros – São Paulo - SP

1.4 Telefone: ()

FAX: ()

1. **Depositante (71):**

1.1 Nome:

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO - FAPESP – Empresa Brasileira

1.2 CGC/CPF (se houver): **43.828.151/0001-45**

1.3 Endereço completo:

Rua Pio XI, 1500 – Alto da Lapa – 05468-901 – São Paulo - SP

1.5 Telefone: ()

FAX: ()

ANEXO DO TÍTULO

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

"...MADEIRA, USO DA MADEIRA, CELULOSE, USO DA CELULOSE, PAPEL, USO DO PAPEL E MÉTODO DE MODULAÇÃO DO NÍVEL DE POLIPEPTÍDEOS EM PLANTAS"

04

ANEXO DOS INVENTORES

7. Inventor (72):

() Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
(art. 6º § 4º da LPI e item 1.1 do Ato Normativo n.º 127/97)

7.1 Nome e CPF:

- (4) Daniela Defavari Nascimento – brasileira, aluna de doutorado, lotada no Departamento de Genética ESALQ-USP
(5) Gunta Gutmaris – brasileira, aluna de mestrado, lotada no Departamento de Genética ESALQ-USP
(6) Maria Inez Fernandes Faraldo – brasileira, pós-doutora, lotada no Departamento de Genética ESALQ-USP

7.2 Endereço:

- (4) Av. Pádua Dias, 11 – 13400-970 – Piracicaba – SP
(5) Av. Pádua Dias, 11 – 13400-970 – Piracicaba – SP
(6) Av. Pádua Dias, 11 – 13400-970 – Piracicaba – SP

13/09/2018

**"CASSETE DE EXPRESSÃO DE GENES, USO DE UM OU MAIS CASSETES
DE EXPRESSÃO DE GENES, MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA
EM CÉLULAS VEGETAIS, MÉTODO DE OBTENÇÃO DE PLANTA
GENETICAMENTE MODIFICADA, PLANTAS GENETICAMENTE
MODIFICADAS, USO DA PLANTA, PLANTAS DERIVADAS, SEMENTES
GENETICAMENTE MODIFICADAS, USO DA SEMENTE GENETICAMENTE
MODIFICADA, MADEIRA, USO DA MADEIRA, CELULOSE, USO DA
CELULOSE, PAPEL, USO DO PAPEL E MÉTODO DE MODULAÇÃO DO
NÍVEL DE POLIPEPTÍDEOS EM PLANTAS"**

10

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção está relacionada a cassetes de expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na rota metabólica da biossíntese de hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos, e a um método de transformação genética em células vegetais através da introdução nas ditas células de um ou mais cassetes de expressão de genes. Além disso, alteração no conteúdo e/ou na composição dos metabólitos dessa rota metabólica em plantas ou partes da planta.

A invenção está relacionada a genes isolados e as respectivas enzimas codificadas envolvidas na biossíntese das hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos.

20

A presente invenção trata também de um método de obtenção da planta geneticamente modificada, suas plantas derivadas e sementes, bem como a madeira, papel e celulose provenientes dessa planta e seus usos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Sabe-se que a composição química da pasta celulósica, principalmente em relação à presença de hemiceluloses, determina as propriedades físicas do papel, bem como as propriedades físico-químicas e ópticas (kappa, viscosidade, rendimento, alvura e reversão de alvura) durante o processo de produção da celulose.

A celulose é o polissacarídeo mais abundante na parede celular do reino vegetal. É um polímero linear composto de unidades $\beta(1 \rightarrow 4)$ anidro glicose. É o principal constituinte da madeira e, por conseguinte, do papel. Outras plantas também apresentam grande quantidade das fibras na parede 5 celular, por exemplo o algodão. As moléculas de celulose estão organizadas em feixes de cadeias paralelas formando fibrilas, que são ligadas umas às outras por materiais poliméricos de hemiceluloses e outras substâncias.

Um outro importante componente da parede celular é a hemicelulose. As hemiceluloses são constituídas por vários polissacarídeos 10 como as glucanas, xilanas, xiloglucanas e mananas. Tais polissacarídeos são constituídos por polímeros contendo dois ou mais dos seguintes açúcares: D-xilosas, D-mânose, D-glicose, D-galactose, L-arabinose, D-ácido glucurônico e o seu derivado 4-O-metilglucuronoxilana, e o D-ácido galacturônico (Vickery e Vickery, (1981) *Secondary plant metabolism*. Pp 335p., Macmillan Press Ltd., 15 London.). Esse grupo de polissacarídeos é caracterizado por uma estrutura central formada por resíduos de 1,4 β -xilana e por ramificações constituídas de moléculas de ácido glucurônico, arabinose e mananas.

Sabe-se que a concentração de hemiceluloses na pasta celulósica é afetada principalmente pelo álcali ativo no cozimento da madeira, 20 de forma que quando é utilizado maior concentração desse reagente, menor retenção de hemiceluloses é observada, além de alteração das propriedades físico-químicas (kappa, viscosidade, rendimento em celulose e alvura).

As hemiceluloses podem ser classificadas de acordo com a quantidade de ácido urônico em hemicelulose ácida, que apresenta grande 25 quantidade desse ácido, e hemicelulose neutra, quando apresenta baixa concentração do mesmo.

Além disso, as concentrações de anidridos urônicos afetam o número kappa e a alvura ISO das pastas celulósicas obtidas, indicando a

formação de complexos que conferem cor à polpa e não somente aos fragmentos de lignina remanescentes.

A retenção de hemicelulose permite a obtenção de polpas com propriedades físico-mecânicas diferenciadas e fibras com composição de superfície distintas, influenciando assim, nas características de papéis de impressão e embalagens.

A biossíntese das hemiceluloses, bem como dos demais componentes da parede celular, dependem do fornecimento dos açúcares (açúcar fosforilado UDP-glicose) produzidos pela fotossíntese nos cloroplastos.

O carbono fixado pela fotossíntese é exportado do cloroplasto para o citoplasma na forma de triose-fosfato (DHAP), iniciando uma série de reações metabólicas cuja direção do fluxo vai depender de vários fatores como o estádio de desenvolvimento das folhas, o estado fisiológico da planta e a condição nutricional, entre outros. Nas folhas jovens, grande parte dos fluxos metabólicos são preferencialmente utilizados para a síntese de lipídeos, via pentoses fosfato (para a síntese de ácidos nucléicos), glicólise (gerando ATP e piruvato), ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA), síntese de aminoácidos, e a via de oxidação dos açúcares, responsáveis pela síntese dos componentes da parede celular.

Outro componente importante na biossíntese das hemiceluloses é a via de oxidação do mio-inositol (Loewus et al., (1962) "Metabolism of mio-inositol in plants: conversion to pectin, hemicellulose, D-xylose, and sugar acids. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 48:421-425 p; Loewus e Dickinson, (1982) *Cyclitols. In:Enciclopedia of plant physiol.* New Series, vol. 13, *Carbohydrates I: Intracellular Carbohydrates*, ed. F.A. Loewus, W. Tanner, 193-216p; Loewus et al., (2000) "Mio-inositol metabolism in plants". *Plant Science*, 150: 1-19p.). O mio-inositol é formado a partir de glicose-6-P, o mesmo precursor de UDP-glicose. Esse composto é um precursor importante para uma série de produtos

metabólicos, como fosfatos de inositol, fosfoinosítideos, derivados metilados e conjugados de IAA, e ácido glucurônico. O primeiro passo na produção do inositol envolve a síntese de mio-inositol-1-fosfato (Ins-1P) a partir de D-glicose-6-P, catalisado pela enzima mio-inositol-3-fosfato sintetase (MIPS, EC 5.5.1.4). O inositol-1-P produzido é, em seguida, desfosforilado pela enzima inositol monofosfatase (IMP, EC 3.1.3.25) para liberar mio-inositol. Esses dois passos metabólicos determinam a formação de um composto essencial para o crescimento normal das células e outras funções essenciais. A redução nos níveis normais de mio-inositol nas células inviabiliza o desenvolvimento de 10 *Saccharomyces cerevisiae* (Henry et al, (1977) "Growth and metabolism of inositol-starved *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Bacteriol.*, 130: 472-484p). Em culturas de células vegetais e tecidos em crescimento a redução na quantidade intracelular de mio-inositol inibe a divisão celular (Biffen e Hanke, (1990) "Reduction in the level of intracellular mio-inositol in culture soybean (*Glycine 15 Max*) cells inhibits cell division". *Biochem. J.*, 265: 809-814p; Loewus e Dickinson, acima; Loewus e Loewus, (1983) "Mio-inositol: Its biosynthesis and metabolism." *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 34: 137-161p; Biswas et al., (1984) "Mio-inositol polyphosphates and their role in cellular metabolism: a proposed involving glucose-6-phosphate and mio-inositol phosphate. In: D.B." Roodyn, 20 ed., *Subcellular Biochemistry*. Plenum Press, London, 237-280p; Loewus, (1990) "Inositol biosynthesis". In: D.J. Moore, W.F. Boss, F. Loewus (eds.), "Inositol Metabolism in Plants". Wiley Liss, New York, 13-19p). A redução da biossíntese do mio-inositol foi obtida em plantas geneticamente modificadas de batata com a supressão da atividade da enzima MIPS, utilizando-se um 25 antisense do cDNA *StIPS* que codifica o gene de batata. A redução da atividade dessa enzima nas folhas, ao redor de 20% dos níveis observados nas plantas selvagens, resultou em forte redução no conteúdo de inositol, galactinol e rafinose (aproximadamente 7%, 5% e 12%, respectivamente). As plantas

geneticamente modificadas apresentaram redução da dominância apical, alteração da morfologia, antecipação da senescência das folhas e redução no peso dos tubérculos. Esses resultados mostram a importância do metabolismo do mio-inositol para a fisiologia e desenvolvimento das plantas.

É conhecido que, para se alterar características agronômicas, geralmente poligênicas, na natureza, genes múltiplos estão envolvidos na expressão do caráter. No caso das rotas metabólicas, enzimas codificadas por genes normalmente independentes, agindo em conjunto, convertem substratos em produto. Um modo de alterar a rota metabólica, conforme a invenção, é através da introdução de cassetes de expressão desses genes que são introduzidos em células vegetais.

No caso da madeira, principal matéria-prima empregada na produção de polpa celulósica, observa-se diferenças significativas em relação ao teor e unidades monoméricas que compõem as hemiceluloses, entre árvores do grupo das folhosas e do grupo das coníferas e, consequentemente, na composição química das polpas resultantes (Rydholm, (1965) "Pulping Process", *Interscience Publishers*, New York, 3, 254p.). A polpa não branqueada de eucalipto, obtida em processo kraft de polpação, é formada predominantemente por uma mistura de carboidratos e uma pequena fração, cerca de 3%, de fragmentos de polímeros de lignina.

Estudos realizados empregando-se madeira de coníferas indicam que é possível promover a retenção das hemiceluloses durante o processo de polpação (Greco et al., (1990) "Hemicellulose retention during kraft pulping". *TAPPI Journal*, April: 223-233p.). O aumento nas concentrações das hemiceluloses em polpas, segundo MacIntosh, D.C. (1963). *TAPPI Journal* 46 (5): 273p. e Spielberg, H. (1966) "The effect of hemicellulose on the mechanical properties of individual pulp fibers". *TAPPI Journal*, 49 (9): 388p., afeta as propriedades físico-mecânicas que aumentam a elasticidade, trabalho até

ruptura e comprimento autoruptura.

Foelkel, C. (1997) "Qualidade da madeira de eucalipto para atendimento das exigências do mercado de celulose e papel." In: *IUFRO Conference on Silviculture and Improvement of Eucalyptus*, Salvador. Anais.

5 Colombo: EMBRAPA/CNPF, v.3, p. 15-22p, demonstrou que processos envolvidos com a qualidade da madeira, estão diretamente relacionados a alterações na escala de produção, fazendo com que os programas de melhoramento da qualidade da floresta e da madeira, com destaque para eucalipto, apresentem aspectos quantitativos e de facilidades processuais. São
10 comuns os programas de melhoramento genético, principalmente na área florestal, que geram árvores que produzem de 12 a 16 toneladas de celulose kraft por hectare por ano. Até o momento, rendimentos significativos são obtidos através do crescimento volumétrico, densidade da madeira, teor de lignina e facilidade de deslignificação e rendimento depurado em celulose no
15 cozimento. Entretanto, são raros os programas de melhoramento que vão além das características agronômicas, desenvolvendo madeira com características relacionadas ao branqueamento do papel e às características de produto final (Foelkel, C., acima).

A energia consumida no refino de polpas também é afetada pela
20 concentração de hemiceluloses através da inserção de água nas regiões cristalinas das fibras (Giertz, H.W. (1948) "Cellulosa och Paper", SPC, 1908-1948 Review, Stockholm, 417: 1908-1948p.). Tal fenômeno diminui a energia consumida no refino, permitindo, além de benefícios econômicos, a obtenção de produtos com propriedades físico-mecânicas superiores.

25 A concentração de hemiceluloses também afeta a composição química da superfície das fibras. Isogai et al. (1997) "Effects of carboxyl groups in pulp on retention of alkylketene dimer". *Journal of Pulp and Paper Science*, 23 (5): 215p, indicam que a presença de ácidos carboxílicos pode afetar as

reações com dímeros de alquil ceteno, composto empregado na colagem de papéis. Os grupos funcionais presentes nas superfícies das fibras afetam também as interações fibra-fibra (Carlsson, G. (1996) "Surface composition of wood pulp fibers-relevance to wettability, sorption and adhesion." *Tese de Doutorado, Royal Institute of Technology, Stockholm, Suécia*), fibra-aditivos para recobrimento (Bierman et al., (1997) "A new sizing agent: styrene-maleic anhydride copolymer with alum mordants." *TAPPI Journal*, 80: 1-277p.) e propriedades coloidais e polieletrolíticas são afetadas pelo tipo de madeira empregada (Rydholm, S.A., acima), condições de polpação (Karlsson e Westermark, (1997) "The significance of glucomannan for the condensation of cellulose and lignin under Kraft pulping conditions." *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 12 (2): 90p; Treimanis, A. (1996) "Wood pulp fiber structure and chemical composition their influence on technological processes." *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 3: 146p) e diferentes reagentes empregados nas etapas de branqueamento (Laine e Sttenius, (1996) "The effect of ECF and TCF bleaching on the surface chemical composition of kraft pulp as determined by ESCA." *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 3: 201p).

Os efeitos das hemiceluloses nas propriedades físico-mecânicas e ópticas da polpa de eucalipto foram investigadas por Milanez et al. ((1982) "Influência das hemiceluloses nas propriedades óticas e físico-mecânicas da polpa." *Proceedings of ABTCP, XV Congresso Anual*, 155) que utilizaram o método de extração em NaOH a 5% como aproximação para o teor de hemiceluloses (pentosanas). Os resultados obtidos indicam que o aumento da concentração de extractivos em NaOH a 5% causa redução de energia de refino e aumento das propriedades físico-mecânicas da pasta celulósica.

É conhecido que a celulose kraft do eucalipto é destinada principalmente à fabricação de dois segmentos de papéis: impressão/escrita e sanitários. Papéis de impressão e escrita devem possuir propriedades como

lisura, opacidade, formação, volume específico, porosidade, printabilidade, resistência, estabilidade dimensional, dentre outras (Foelkel, C., acima).

O método escolhido para introduzir genes exógenos no interior de células vegetais é importante para o sucesso da transformação em plantas. O princípio desses métodos envolve a inserção de genes de interesse no interior do genoma de planta hospedeira junto a um gene marcador que permite a seleção de células geneticamente modificadas, resistentes a um determinado antibiótico, herbicida ou outro agente seletivo a partir de células não geneticamente modificadas. Esses métodos, normalmente, são eficientes para a introdução de um gene dentro da planta hospedeira. A transformação de plantas em programas de biotecnologia consiste na introdução de um fragmento (cassete de expressão de genes) no genoma da célula alvo. As plantas férteis devem ser geradas a partir de uma única célula transformada e o cassete de expressão introduzido deve ter a capacidade de ser transmitido às gerações seguintes por meio das sementes.

DESCRÍÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção utiliza técnicas de biologia molecular, cultura de tecidos e transferências de genes, para alterar a expressão dos genes envolvidos, tanto no sentido *sense* como *antisense*, na codificação das enzimas que participam da rota metabólica da biossíntese das hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos. Além disso, trata do isolamento de genes responsáveis pela característica de interesse, localizados e isolados dos demais genes do genoma, e introduzidos, em vetores binários, para transformação da planta alvo. Dessa forma, cassetes de expressão de genes são introduzidos em células vegetais, de forma controlada, modificando-se o genoma do organismo receptor, independentemente do processo de fecundação.

A presente invenção, em uma de suas alternativas, refere-se a

cassetes de expressão de genes que codificam enzimas relacionadas com a biossíntese de hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos e o uso desses cassetes.

A presente invenção relaciona-se ainda à alteração na expressão dos genes que codificam as enzimas acima citadas, além de alterações na composição e/ou conteúdo da biossíntese das hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos. Ainda trata da modulação da expressão de genes que codificam as enzimas envolvidas com a biossíntese dos compostos acima citados, bem como da sua concentração e/ou nível desses polipeptídeos, nas plantas ou parte da planta. A modulação é afetada pelo aumento ou diminuição da concentração e/ou nível desses polipeptídeos, da presente invenção, nas plantas.

A presente invenção refere-se ainda à um método de transformação genética em células vegetais em que se introduz um ou mais cassetes de expressão de genes que codificam enzimas relacionadas com a biossíntese de hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos.

A presente invenção refere-se também a plantas geneticamente modificadas e ao método de obtenção das mesmas. Trata, ainda, de plantas derivadas das plantas geneticamente modificadas, que apresentam um ou mais cassetes de expressão de genes que codificam enzimas relacionadas com a biossíntese de hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos.

A presente invenção refere-se também a sementes geneticamente modificadas provenientes da planta geneticamente modificada e, por fim, trata da madeira e celulose proveniente da dita planta geneticamente modificada e de seus usos.

O método de transformação genética de células vegetais da presente invenção utiliza técnicas conhecidas como biobalística, eletroporação, microinjeção, macroinjeção ou transformação via *Agrobacterium tumefaciens*,

para a introdução de cassetes de expressão de genes de interesse, tanto para a repressão, como para a superexpressão dos mesmos na célula alvo. Preferencialmente, mas não limitado a apenas esta alternativa, o cassete é clonado no vetor binário de transformação genética *Agrobacterium tumefaciens*. Essa bactéria é encontrada naturalmente no solo, e é considerada como engenheira natural, sendo eficiente vetor para transformação de plantas.

De acordo com a invenção, cassetes de expressão de genes são introduzidos em células vegetais, de forma controlada, modificando-se o genoma do organismo receptor, independentemente do processo de fecundação. O gene responsável pela característica de interesse é localizado e isolado dos demais genes do genoma e introduzido em vetores binários para transformação da célula alvo. O fenômeno da totipotência permite que plantas geneticamente modificadas sejam obtidas a partir de células originalmente transformadas com construções químéricas.

Os ditos cassetes de expressão de genes de acordo com a presente invenção realizam a superexpressão, via *sense*, ou repressão, via *antisense*, de um ou mais genes que codificam as ditas enzimas de interesse.

A planta geneticamente modificada de acordo com a presente invenção contém um ou mais dos cassetes de expressão de genes que codificam as ditas enzimas de interesse, sendo que os genes podem ser expressos de forma *sense* ou *antisense*.

A presente invenção apresenta também um método de obtenção da planta geneticamente modificada que compreende as etapas de:

- (a) transformação genética de células vegetais através da introdução de cassetes de expressão de genes que codificam as enzimas de interesse da presente invenção, por exemplo por biobalística, eletroporação, microinjeção, macroinjeção, ou através de *Agrobacterium tumefaciens*;
- (b) regeneração de células da etapa (a);

JF

(c) expressão do DNA construído nas células da etapa (b) em quantidade suficiente para alterar de maneira substancial a rota metabólica da biossíntese de hemiceluloses e/ou celulose e/ou ácidos urônicos; e
(d) obtenção da planta transformada.

5 A introdução de um ou mais cassetes de expressão de genes, nas células vegetais, provoca alterações na rota metabólica das hemiceluloses, particularmente xilanas, celulose e/ou ácidos urônicos, particularmente o ácido glucurônico, alterando o rendimento do processo, consumos químicos e qualidade do produto, de acordo com o interesse da indústria. Com isso, a
10 presente invenção melhora a qualidade da madeira nas aplicações de produção de celulose e papel.

Um objeto da presente invenção visa melhorar a qualidade da madeira, através da modificação da composição química das fibras da parede celular dos vegetais, com destaque para angiospermas, particularmente, 15 eucalipto, e gimnospermas, alterando a rota metabólica de hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos. Mais especificamente, a alteração da rota metabólica é obtida pela modulação da expressão de um ou mais genes, em separado ou em conjunto, tanto no sentido *sense* quanto *antisense*, responsáveis pelas enzimas que participam da biossíntese das hemiceluloses, 20 celulose e/ou ácidos urônicos. Isso é obtido através da introdução de cassetes de expressão de genes que codificam enzimas capazes de alterar a rota metabólica de hemiceluloses, celulose e/ou ácido urônico, em particular aumentando-se a proporção de xilanas e/ou reduzindo e/ou aumentando o conteúdo de ácidos urônicos.

25 As enzimas de interesse de acordo com a presente invenção, que estão envolvidas na biossíntese de hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos são escolhidas do grupo que contém: mio-inositol-1-fosfato sintase (EC: 5.5.1.4), mio-inositol monofosfatase (EC:3.1.3.25), mio-inositol oxigenase



(EC: 1.13.99.1), β -glucuronidase (EC: 3.2.1.31), glucoronoquinase (EC: 2.7.1.43), glucoronosil-transferase (EC: 2.4.1.17), glucoronato 1-fosfato uridiltransferase (EC: 2.7.7.44), fosfoglucomutase (EC: 5.4.2.2), UDP-glicose pirofosforilase (EC: 2.7.7.9), UDP-glicose desidrogenase (EC: 1.1.1.22), UDP-D-glucoronato carboxilase (EC: 4.1.1.35), 1,4- β -D-xilana sintase (EC: 2.4.2.24) e celulose sintase (EC: 2.4.1.1).

Como sabe o homem da técnica, a menção a "E.C." seguido de um número, no parágrafo acima, refere-se à nomenclatura de enzimas da IUBMB - International Union of Biochemistry and Molecular Biology.

Mais particularmente, as enzimas de interesse de acordo com a presente invenção são escolhidas dentro do grupo que contém: mio-inositol oxigenase (EC: 1.13.99.1), β -glucuronidase (EC: 3.2.1.31), glucoronoquinase (EC: 2.7.1.43), glucoronato 1-fosfato uridiltransferase (EC: 2.7.7.44), UDP-glicose pirofosforilase (EC: 2.7.7.9), UDP-glicose desidrogenase (EC: 1.1.1.22) e UDP-D-glucoronato carboxilase (EC: 4.1.1.35).

Ainda outro objeto da presente invenção é a madeira com qualidades químicas e propriedades físicas distintas do estado da técnica, obtida a partir da planta geneticamente modificada conforme a presente invenção, que permite uma diminuição significativa nos custos do processo industrial e melhorias no produto final como o papel, encontrando também uso em construção civil, construção naval, fabricação de móveis, utensílios, além da produção de polpa celulósica, sendo utilizada particularmente para a produção de polpa celulósica e papel.

A presente invenção direciona-se também a outras plantas, entre angiospermas e gimnospermas, além do eucalipto, como por exemplo o trigo, uma vez que a farinha de trigo integral, extraída do trigo, apresenta abundante quantidade de fibras na parede celular. Pode-se também mencionar o algodão, para o qual alterações também podem ser observadas, uma vez que o algodão

é composto de celulose quase na sua totalidade. A expressão dos cDNAs no sentido *sense* ou *antisense* está diretamente relacionada à atividade metabólica das principais enzimas da biossíntese das hemiceluloses e à alteração da composição da parede celular.

5 No caso particular de árvores, a retenção das hemiceluloses permite a obtenção de polpas com propriedades físico-mecânicas diferenciadas e fibras com composição de superfície distintas, que influenciam as características de papéis para impressão e embalagens, e papéis de absorção ("tissue"). Além de afetar as características do produto, a retenção das
10 hemiceluloses favorece o desempenho das máquinas produtoras de papéis.

Outro objeto da presente invenção é celulose obtida a partir da madeira da planta geneticamente modificada, e o uso da celulose para a fabricação de papel que pode, entre outros, ter uso em construção civil, indústria de móveis, papel para impressão, embalagens e papel de absorção.
15 Preferencialmente, o papel proveniente da celulose modificada da presente invenção encontra usos como papel para impressão, embalagens e papel de absorção.

Ainda outro objeto da presente invenção são sementes geneticamente modificadas, que apresentam um ou mais cassetes de
20 expressão de genes codificadores das enzimas de interesse da presente invenção e o uso dessas sementes para a obtenção de plantas geneticamente modificadas.

Um outro objeto da presente invenção é incrementar o rendimento do processo de produção de celulose, bem como alterar a qualidade da pasta
25 celulósica não branqueada e branqueada, modulando os teores de ácidos urônicos e/ou celulose e/ou hemiceluloses das plantas modificadas.

O uso de métodos de transgene está associado aos programas de melhoramento convencional de plantas, acelerando o processo de obtenção

de produtos com características específicas e desejáveis no setor industrial, estando relacionado com melhoramento florestal e melhoramento genético de plantas.

A enzima mio-inositol oxigenase foi recentemente clonada de uma biblioteca de cDNA de rim de porco (Arner et al, 2001. "Mio-inositol oxygenase: molecular cloning and expression of a unique enzyme that oxidizes mio-inositol and D-chiro-inositol". *Biochemical Journal*, 360 2: 313-320). Esta seqüência foi usada como base para a confecção de primers usados na amplificação de regiões ortólogas presentes no genoma do eucalipto, possibilitando assim a localização do gene *miox* no genoma das árvores. A enzima de interesse, β-glucuronidase foi clonada de *Escherichia coli* e foi expressa tanto no sentido *sense* como *antisense*, em *Eucalyptus grandis*.

De acordo com a presente invenção, o termo "planta geneticamente modificada" obtida pelo método citado anteriormente inclui célula, órgão, tecido, semente, a planta inteira ou suas progêniens.

"Plantas derivadas", de acordo com a presente invenção, refere-se a plantas derivadas das plantas geneticamente modificadas com um ou mais cassetes de expressão de genes que codificam as enzimas de interesse da presente invenção. As ditas plantas derivadas apresentam alteração na composição química da parede celular através da alteração na rota metabólica da biossíntese de hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos.

Os termos "expressão *sense*" e "expressão *antisense*", de acordo com a presente invenção referem-se, respectivamente, a superexpressão ou repressão dos genes que codificam as enzimas de interesse.

De acordo com a presente invenção entende-se por "cassete de expressão de genes" cassetes de expressão que, independentemente de sua construção, possuem genes que codificam as enzimas de interesse da presente invenção.

A presente invenção propõe alterar a biossíntese das hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos, consequentemente, melhorando a qualidade da madeira. Com a finalidade de entender as estratégias que foram utilizadas na invenção, é necessário conhecer a bioquímica da biossíntese das 5 hemiceluloses e as enzimas que participam do processo.

Os anidridos urônicos são benéficos no cozimento da madeira, através da proteção de grupos terminais de hemiceluloses, impedindo reações de descascamento ("peeling"). A relação entre anidridos urônicos e as propriedades ópticas indica que estes componentes formam compostos 10 cromóforos que conferem coloração marrom à polpa após branqueamento convencional, e consequentemente, consomem mais reagentes oxidantes no processo de branqueamento. A partir desses resultados, a depositante desenvolveu a tecnologia da presente invenção, visando a obtenção de plantas, mais particularmente árvores, com concentrações alteradas de xilanas 15 e de anidridos urônicos.

BREVE DESCRIÇÃO DA FIGURA E DE TERMOS UTILIZADOS

A presente invenção é melhor entendida a partir da seguinte descrição de alguns termos e figura que fazem parte do presente pedido.

a) E-Value: "Expected Value" – Discrimina o "background", ao 20 acaso que existe no alinhamento entre seqüências de nucleotídeos. Quanto menor o valor de E-value, ou mais próximo de zero, mais significativo é o alinhamento entre as seqüências. Entretanto, para seqüências curtas, como observamos para o caso da análise das seqüências dos primers, podem ocorrer altos valores de E-value para seqüências virtualmente idênticas. Nesse 25 caso, o cálculo do E-value leva em consideração o comprimento da seqüência em questão. Pois uma seqüência curta tem alta probabilidade de ocorrer na base de dados puramente por chance.

b) GI number: Número de acesso do gene no banco de dados do

NCBI (National Center for Biotechnology Information).

30

c) ORF: "Open Reading Frame" ou seqüência aberta de leitura, que corresponde ao c-DNA.

5 d) Bit Score: Escala de versão do alinhamento utilizada na análise estatística do sistema BLAST do NCBI.

e) Cluster: Seqüências organizadas em grupos.

f) EST: "Expressed Sequence Tag" - uma seqüência curta de cDNA (DNA complementar).

10 g) FASTA: texto sem formatação, mas com quebras de linhas, contendo 60 caracteres por linha. Modelo padrão para a comparação algorítmica de uma seqüência eurística, usada para busca de seqüências no banco de dados através do alinhamento da mesma.

15 h) FRAME NUMBER: possíveis matrizes de leitura (três em cada sentido: +1, +2, +3, -1, -2 e -3), na busca de um trecho de DNA do tamanho de um gene, começando-se com o códon de iniciação ATG, e finalizando com um códon terminador (TAA, TAG ou TGA).

i) *nptII*: gene da nopalina fosfotransferase II, que confere resistência à canamicina (Bevan et al., 1983);

20 j) *htp*: gene da higromicina B fosfotransferase, que confere resistência à higromicina (van den Elzen et al., 1985)

k) *barn*: gene da bialafos acetitransferase, que confere resistência ao glufosinato de amônia (Thompson et al., 1987)

25 l) BLAST - "Basic Local Alignment Search Tool": Altschul et al, (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs". *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402p.

m) BLAST N: confronta a seqüência de nucleotídeos a ser analisada contra às seqüências de nucleotídeos disponíveis, da base de dados do NCBI.

n) BLAST X: confronta a seqüência de nucleotídeos a ser analisada contra às seqüências de proteínas disponíveis, da base de dados do NCBI.

- o) BLAST 2 Sequences: faz a análise comparativa de alinhamento múltiplo de 2 ou mais seqüências de nucleotídeos ou proteínas.

A figura 1 apresenta as várias rotas metabólicas até chegar à celulose, hemiceluloses e ácidos glucurônicos. O metabólito chave de todo o processo é a UDP-glicose que serve de matéria prima para a síntese de sacarose, celulose e hemicelulose, sendo portanto, um componente importante na partição do carbono entre os vários compostos.

A figura 1 mostra também o nome das enzimas, com seus códigos de numeração internacional (EC), codificadas pelos genes que foram isolados na invenção, entre outros: EC: 5.5.1.4, mio-inositol-1-fosfato sintase (MIPS); EC: 3.1.3.25, mio-inositol monofosfatase (IMP); EC: 1.13.99.1, mio-
15 inositol oxigenase; EC: 3.2.1.31, β -glucuronidase; EC: 2.7.1.43, glucoronoquinase; EC: 2.4.1.17, glucoronosil-transferase; EC: 2.7.7.44, glucoronato 1-fosfato uridiltransferase; EC: 5.4.2.2, fosfoglucomutase; EC:
20 2.7.7.9, UDP-glicose pirofosforilase; EC: 1.1.1.22, UDP-glicose desidrogenase, EC: 4.1.1.35, UDP-D-glucoronato carboxilase; EC: 2.4.2.24, 1,4-beta-D-xilana sintase, EC: 2.4.1.1, celulose sintase.

É ilustrada uma representação esquemática da formação de xilanases e ácidos glucurônicos a partir do açúcar glicose 6-P e da via de oxigenação das enzimas mencionadas no parágrafo anterior. Os quadros em branco indicam as enzimas cujos genes ainda não foram clonados e
25 seqüenciados de nenhum organismo.

MÉTODO DE INTRODUÇÃO DE CASSESTES DE EXPRESSÃO DE GENES EM PLANTAS

O que se descreve a seguir é, de forma meramente ilustrativa e exemplificativa, não apresentando caráter limitante, uma maneira de isolar

alguns dos genes da invenção, independente de qualquer alteração que esses possam ter, envolvidos na biossíntese de hemiceluloses, celulose, e/ou ácidos urônicos:

1) gene da enzima UDP-glicose desidrogenase (EC: 1.1.1.22);

5 2) gene *uxs1* da enzima UDP-D-glucuronato carboxilase (EC: 4.1.1.35);

3) gene *miox* da enzima mio-inositol oxigenase (EC: 1.13.99.1);

4) gene da enzima UDP-glicose pirofosforilase (EC: 2.7.7.9);

5) gene da enzima glucuronoquinase (EC: 2.7.1.43);

10 6) gene da enzima glucuronato 1-fosfato uridiltransferase (EC: 2.7.7.44);

Foi realizada uma busca, a partir de EC (código enzimático) no Banco de Dados do NCBI - "National Center for Biotechnology Information", no site www.ncbi.nlm.nih.gov, que reúne as seqüências de nucleotídeos dos 15 organismos já seqüenciados e disponíveis para consulta. São ali fornecidos links para análise, como:

A) BLAST N: confronta a seqüência de nucleotídeos a ser analisada contra as seqüências de nucleotídeos disponíveis, da base de dados do NCBI.

20 B) BLAST X: confronta a seqüência de nucleotídeos a ser analisada contra as seqüências de proteína disponíveis, da base de dados do NCBI.

C) BLAST 2 Sequences: faz a análise comparativa de alinhamento múltiplo de 2 ou mais seqüências de nucleotídeos ou proteínas.

25 Como resultado obtivemos as seqüências dos genes codificadores das enzimas, acima relacionadas, como segue:

1) EC: 1.1.1.22: gene da enzima UDP-glicose desidrogenase de soja *Glycine max* (Gene Bank accession nº U53418).

33

2) EC: 4.1.1.35: gene *uxs1* da enzima UDP-D-glucuronato carboxilase de ervilha, *Pisum sativum* (Gene Bank accession nº BAB409674).

3) EC: 1.13.99.1: gene *miox* da enzima mio-inositol oxigenase, de *Sus scrofa* (Gene Bank accession nº AAL39076).

5 4) EC: 2.7.7.9: gene da enzima UDP-glicose pirofosforilase, de *Solanum tuberosum* (Gene Bank accession nº U20345).

5) EC: 2.7.1.43: gene que codifica a enzima glucuronoquinase.

6) EC: 2.7.7.44: gene que codifica a enzima glucuronato 1-fosfato uridiltransferase.

10 A seqüência em questão pode ser comparada ao banco de dados de proteínas utilizando-se o BLASTP. E dentro dessa opção é oferecida a comparação de domínios conservados de proteínas utilizando-se o CDS ("Conserved Domain Search") contra a base de dados CDD ("Conserved Domain Database") que reúne as famílias de proteínas.

15 Para todas as enzimas relacionadas acima foram encontradas seqüências gênicas nos genomas dos organismos vivos, com alto grau de homologia protéica e conservação dos domínios indicados por CDS.

20 Após a identificação de seqüências candidatas para cada gene, as mesmas foram utilizadas para a síntese de primers específicos, para cada ORF, com o auxílio do programa Primer 3 (por exemplo como encontrado nos sites www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html, ou [/www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi](http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi)) que permite fazer a confecção de primers específicos para uma determinada seqüência de nucleotídeos. Esses primers foram utilizados como iniciadores, na amplificação da região 25 codificadora inteira, dos genes relacionados, através da técnica de PCR (reação em cadeia de polimerase, em inglês, "polymerase chain reaction"). O produto resultante da reação de PCR foi seqüenciado e submetido à confirmação de identidade, com os bancos de dados do NCBI, com auxílio do

Programa BLAST. Esse produto de reação de PCR foi utilizado como sonda na técnica de Southern Blot para confirmação da presença dessa seqüência no genoma de plantas.

O isolamento dos genes de interesse, independente de qualquer alteração que esse possa ter, foi realizado através da busca da ORF ("Open Reading Frame" - Fase Aberta de Leitura), correspondente às enzimas relacionadas anteriormente, para posterior clonagem da mesma, em vetores binários, com destaque para o vetor de nome comercial Gateway, da empresa americana Invitrogen Corporation, mas não limitado a esse. Primers foram sintetizados e a ORF correspondente a cada enzima foi determinada a partir das seqüências desses genes de *Glycine max* para UDP-glicose desidrogenase; *Pisum sativum* para UDP-D-glucuronato carboxilase; *Solanum tuberosum* para UDP-glicose pirofosforilase e *Sus scrofa* para mio-inositol oxigenase, através do Programa BLAST do NCBI.

O cassete de expressão do gene de interesse foi clonado em um vetor binário de transformação de plantas, para a superexpressão ou repressão desse gene em plantas com destaque para tabaco e eucalipto, pela técnica de transformação de plantas, via *Agrobacterium*.

As seqüências dos genes das enzimas UDP-glicose desidrogenase (EC 1.1.1.22), UDP-D-glucoronato carboxilase (EC 4.1.1.35), mio-inositol oxigenase (EC 1.13.99.1), UDP-glicose pirofosforilase (EC 2.7.7.9), glucuronoquinase (EC 2.7.1.43) e glucuronato 1-fosfato (EC 2.7.7.44) foram utilizadas para a confecção de primers específicos, abrangendo a seqüência completa desses genes. O produto da reação foi seqüenciado e submetido à confirmação de identidade com auxílio do programa BLAST-NCBI. Os cDNAs das ditas enzimas, obtido como produto da reação de RT-PCR, com auxílio do kit "SuperScriptPlasmid System for cDNA Synthesis and Cloning with Gateway Technology", da Invitrogen, de acordo com recomendações do fabricante, foi

clonado nos vetores Gateway (Karimi et al., (2002) "Gateway vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation." *Trends in plant Science*, 7 (5): 193-195p), entre outros.

Como no método de clonagem via Gateway o produto de PCR 5 está flanqueado por sítios de recombinação *att*, pôde ser clonado de forma direcional, tanto no sentido *sense* como *antisense*, nesse vetor, que contêm sítios de recombinação compatíveis, numa reação mediada pela Gateway LR clonase da Invitrogen.

O vetor binário Gateway já possui genes marcadores *nptII*, *htp* ou 10 *bar*, para seleção dos transformantes. Todos esses genes de seleção estão sob o controle transcracional do promotor e terminador *nos*, da nopalina sintetase (Hellens et. al, (2000) "pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation." *Plant Molecular Biology*, 42: 819-832p), localizados na borda esquerda do T-DNA. O sítio de recombinação, 15 para inserção do fragmento de interesse está localizado na borda direita do T-DNA.

No caso específico da clonagem no vetor Gateway, a superexpressão ou repressão das seqüências de cDNA das enzimas foi feita utilizando-se o sítio de clonagem localizado na borda direita do T-DNA, entre o 20 promotor e o terminador do vírus do mosáico da couve-flor (CaMV) 35S (Odell et. al, (1985) "Identification of DNA sequences required for activity of the couliflower mosaic virus 35S promoter." *Nature*, 313: 810-812p), além de outros promotores.

A alteração da biossíntese das xilanases pode ser obtida 25 aumentando-se a expressão do gene *ugd* que codifica a enzima UDP-glicose desidrogenase. Essa enzima é considerada chave pois regula o fluxo de carbono para a produção de amido e sacarose, e também é regulada pela disponibilidade de mio-inositol.

Assim, numa realização da presente invenção foi clonado o gene *ugd* da UDP-glicose desidrogenase de *Eucalyptus grandis*, para superexpressá-lo em plantas de tabaco e *Eucalyptus* spp, e nas demais plantas de interesse.

5 Em outra realização, o objetivo de clonar o gene *uxs 1* responsável pela produção da enzima UDP-D-glucoronato descarboxilase de árvores, foi para utilizá-lo na alteração da produção de UDP-D-xilose em árvores e plantas. Dessa forma, é possível avaliar-se o impacto da superexpressão desse gene na formação da parede celular, e o efeito sobre o
10 desenvolvimento das plantas.

A biossíntese de UDP-D-xilose, importante precursor na síntese de hemicelulose, é mediada pela enzima UDP-D-glucuronato carboxilase (EC 4.1.1.35), que converte UDP-D-glucoronato em UDP-D-xilose em uma reação irreversível (Bar-Peled et al, (2001) "Functional cloning and characterization of
15 a UDP-glucuronic acid decarboxylase: the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* elucidates UDP-xylose synthesis." *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 98 (21): 12003-12008p).

Com a finalidade de alterar a regulação metabólica da biossíntese das hemiceluloses, um objetivo da presente invenção foi clonar os genes responsáveis pela produção das enzimas alvo, de árvores e plantas, para posteriormente, afetar a superexpressão ou repressão desses genes, na biossíntese dos polissacarídeos de parede celular e no desenvolvimento de plantas de tabaco (*Nicotinana tabacum*), e de árvores, com destaque para *Eucalyptus* spp., entre outras plantas.

25 O método de acordo com a presente invenção é adicionalmente explicado por meio da figura 1, que mostra esquematicamente a rota metabólica da biossíntese das hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos, além da formação das xilanas e ácidos glucurônicos a partir do açúcar Glicose

6-P e da via de oxigenação do mio-inositol.

Em outro aspecto ainda, a invenção refere-se a um método de modulação do nível de polipeptídeos em plantas, ditos polipeptídeos estando envolvidos na biossíntese das hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de a) introdução na célula vegetal de um ou mais cassetes de expressão de genes de acordo com a reivindicação 1; b) regeneração da célula vegetal; c) indução da expressão dos ditos polipeptídeos por tempo suficiente para modular o nível da biossíntese de hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos nas ditas plantas.

10

EXEMPLOS

Os exemplos a seguir são ilustrativos, visando meramente apresentar de forma explicativa certas concretizações particulares da invenção. Não devem, portanto, ser considerados limitantes à sua extensão mais ampla, que é delimitada apenas pelas reivindicações anexas.

15

EXEMPLO 1

ISOLAMENTO DO RNA TOTAL

Nesta realização, o RNA total foi obtido com auxílio do protocolo de SALZMAN, R.A , FUJITA, T., ZHU-SALZMAN, K., HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A. (1999) (An Improved RNA Isolation Method for Plant Tissues Containing High Levels of Phenolic Compounds or Carbohydrates - Plant Molecular Biology Reporter 17: 11-17, 1999).

O RNA total foi isolado a partir de raízes de eucalipto. Raízes de eucalipto, maceradas em nitrogênio líquido, foram transferidas para o tampão de extração, seguido de duas a três extrações com clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 24:1(v/v) e centrifugação para separação das fases aquosa e orgânica. A precipitação de proteínas e carboidratos remanescentes na fase aquosa, foi feita por precipitação dessa, com NaCl e etanol, à -20° C, por um período mínimo de 3 horas. A adição de 25:24:1 (fenol:clorofórmio:álcool

38

isoamílico), ao sobrenadante resultante da precipitação anterior, seguida de centrifugação de forma a eliminar-se remanescentes de compostos fenólicos, foi conduzida também para a separação da fase aquosa da fase orgânica. Uma segunda precipitação com NaCl e etanol foi efetuada, a -20°C, também por um período mínimo de 3 horas. O "pellet" contendo o RNA total foi ressuspenso em água DEPC (dietilpirocarbonada, do inglês "diethyl pirocarbonated") seguido de precipitação com cloreto de lítio. O precipitado foi lavado em etanol 80%, antes da quantificação por espectrofotometria a um comprimento de onda de 260nm e verificação em gel de agarose 1% em tampão TAE 1x.

10

EXEMPLO 2

EXTRAÇÃO DO RNA MENSAGEIRO (mRNA)

O RNA mensageiro foi isolado com o auxílio de um kit de purificação de mRNA de nome comercial "Dynabeads" da empresa americana DYNAL Biotech, de acordo com normas do fabricante.

15

EXEMPLO 3

SÍNTESE DOS PRIMERS ESPECÍFICOS

Às seqüências dos primers *sense* dos genes que foram superexpressados (UDP-glicose desidrogenase, UDP-D-glicose carboxilase, UDP-glicose pirofosforilase), associou-se uma seqüência CACC de direcionamento na região imediatamente anterior à região 5', ou seja, ao códon de iniciação da transcrição.

À seqüência do primer *antisense* do gene da mio-inositol oxigenase associou-se uma seqüência CACC de direcionamento na região imediatamente posterior à região 3', ou seja, ao códon de terminação.

25

EXEMPLO 4

SÍNTESE DO cDNA

A síntese do cDNA, seguida de amplificação com primers específicos correspondentes as ORFs desses genes foi realizada, em um único

passo, com o auxílio do kit da empresa Invitrogen, denominado "SuperScript One-Step RT-PCR with Platinum *Taq*", de acordo com normas do fabricante.

EXEMPLO 5

CLONAGEM DO PRODUTO DA REAÇÃO RT-PCR

5 A clonagem do produto resultante da reação de amplificação com os primers específicos que flanqueiam as ORFs por completo foi feita com auxílio do kit da empresa Invitrogen, denominado "pENTR-Directional TOPO Cloning Kit", de acordo com as normas do fabricante.

EXEMPLO 6

REAÇÃO DE RECOMBINAÇÃO DE LR CLONASE

A reação de recombração, no caso particular, entre a construção químérica do vetor pENTR e do vetor binário Gateway de transformação de plantas foi mediada pela LR clonase da empresa Invitrogen (Karimi et al., acima).

15

EXEMPLO 7

MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO

O método de obtenção de plantas geneticamente modificadas de eucalipto estabelecido no Laboratório de Genética Fisiológica do Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, conforme pedido de patente brasileiro PI0003908, utiliza o método de transformação de plantas via *Agrobacterium tumefaciens* para introdução dos genes. O material vegetal utilizado é a semente de eucalipto. As sementes são esterilizadas antes de serem semeadas em meio MS (Murashige and Skoog, 1962), onde permanecem por 15 dias, até o desenvolvimento de plântulas. Os cotilédones dessas plântulas são os explantes a serem inoculados com *A. tumefaciens*. As construções utilizadas possuem, além do gene de interesse, o gene NPTII de resistência ao antibiótico seletivo canamicina. A bactéria é cultivada por 24 h em meio AB

60

líquido até atingir uma densidade ótica próxima a 0,8 (OD_{660nm}). Os cotilédones extraídos das plântulas são inoculados com a cultura bacteriana durante 6 h. Após esse período, os explantes são transferidos para meio MS sólido, por um período de 48 h de cultivo. Os cotilédones são então transferidos para meio de 5 formação de calos (MS acrescido de 5 μM TDZ e 5 μM de ANA) contendo 50 mg/L de canamicina e 400 mg/L de cefotaxima. Os calos que se desenvolveram são transferidos para meio de formação de brotações (MS com 5 μM TDZ e 2,5 μM de ANA) acrescido de 25 mg/L de canamicina. As brotações que apresentam desenvolvimento satisfatório são沿adas e 10 enraizadas. As plantas que se desenvolvem a partir dessas brotações, são então mantidas sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade em casa de vegetação. A presença do transgene é confirmada mediante a técnica de "Southern Blot", a partir do DNA genômico dos transformantes.

15

EXEMPLO 8

a) A determinação do padrão de expressão do transgene foi realizada por "Northern Blot". O RNA total foi isolado a partir de plantas transformantes, provenientes de eventos independentes de transformação, de acordo com o exemplo 5. As amostras de RNA foram analisadas por "Northern Blot" para determinação do padrão de expressão de cada transgene relacionado a eventos independentes de transformação.

b) Determinação do nível de concentração das xilanas e do ácido glucurônico, após obtenção e crescimento das plantas transformadas.

REIVINDICAÇÕES

1. CASSETE DE EXPRESSÃO DE GENES, caracterizado pelo fato de compreender um ou mais genes que codificam uma ou mais enzimas escolhidas dentro do grupo que contém: mio-inositol-1-fosfato sintase (EC: 5.5.1.4), mio-inositol monofosfatase (EC: 3.1.3.25), mio-inositol oxigenase (EC: 1.13.99.1), β -glucuronidase (EC: 3.2.1.31), glucoronoquinase (EC: 2.7.1.43), glucoronosil-transferase (EC: 2.4.1.17), glucoronato 1-fosfato uridiltransferase (EC: 2.7.7.44), fosfoglucomutase (EC: 5.4.2.2), UDP-glicose pirofosforilase (EC: 2.7.7.9), UDP-glicose desidrogenase (EC: 1.1.1.22), UDP-D-glucoronato carboxilase (EC: 4.1.1.35), 1,4- β -D-xilana sintase (EC: 2.4.2.24) e celulose sintase (EC: 2.4.1.1).
2. CASSETE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o dito grupo contém: mio-inositol oxigenase (EC: 1.13.99.1), β -glucuronidase (EC: 3.2.1.31), glucoronoquinase (EC: 2.7.1.43), glucoronato 1-fosfato uridiltransferase (EC: 2.7.7.44), UDP-glicose pirofosforilase (EC: 2.7.7.9), UDP-glicose desidrogenase (EC: 1.1.1.22) e UDP-D-glucoronato carboxilase (EC: 4.1.1.35).
3. CASSETE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser clonado no vetor binário de transformação *Agrobacterium tumefaciens*.
4. CASSETE, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato das ditas enzimas estarem envolvidas na biossíntese de hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos.
5. CASSETE, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato das hemiceluloses serem xilanas.
6. CASSETE, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de um ácido urônico ser o ácido glucurônico.
7. USO DE UM OU MAIS CASSETES DE EXPRESSÃO DE

GENES, caracterizado pelo fato de ser para a superexpressão ou repressão dos genes da reivindicação 1.

8. MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA EM CÉLULAS VEGETAIS, caracterizado pelo fato de se introduzir um ou mais 5 cassete de acordo com uma das reivindicações 1 a 6 no genoma da planta.

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato do cassete ser introduzido na célula via eletroporação, biobalística, microinjeção, macroinjeção ou via *Agrobacterium tumefaciens*.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado 10 pelo fato do cassete ser introduzido na célula via *Agrobacterium tumefaciens*.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de alterar a rota metabólica da biossíntese de hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos.

12. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado 15 pelo fato da dita célula vegetal ser uma célula de qualquer parte da planta, como raiz, tronco, fruto, folha, semente ou flor.

13. MÉTODO DE OBTENÇÃO DE PLANTA GENETICAMENTE MODIFICADA, caracterizado pelo fato de compreender as seguintes etapas:

20 a) transformação genética de células vegetais de acordo com uma das reivindicações 8 a 12;

b) regeneração de células da etapa (a);

c) expressão do DNA construído nas células da etapa (b) em quantidade suficiente para alterar de maneira substancial a rota metabólica da 25 biossíntese de celulose, e/ou de hemiceluloses, e/ou de ácidos urônicos; e

d) obtenção da planta modificada.

14. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato da dita planta modificada ser uma célula, um órgão, um tecido,

semente, a planta inteira, ou suas plantas derivadas.

15. PLANTA GENETICAMENTE MODIFICADA, caracterizada pelo fato de conter um ou mais cassetes de expressão de acordo com uma das reivindicações 1 a 6.

5 16. PLANTA GENETICAMENTE MODIFICADA, caracterizada pelo fato de ter sido originada a partir do método de acordo com a reivindicação 13.

17. PLANTA, de acordo com uma das reivindicações 15 ou 16, caracterizada pelo fato de ser uma angiosperma.

10 18. PLANTA, de acordo com uma das reivindicações 15 ou 16, caracterizada pelo fato de ser uma gimnosperma.

19. PLANTA, de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de ser Eucalipto.

20. USO DA PLANTA, de acordo com uma das reivindicações 15 a 19, caracterizado pelo fato de ser para a obtenção da madeira e/ou celulose.

21. PLANTAS DERIVADAS, caracterizada pelo fato de ser originada a partir da planta geneticamente modificada de acordo com uma das reivindicações 15 ou 16.

20 22. SEMENTE GENETICAMENTE MODIFICADA, caracterizada pelo fato de conter um ou mais cassetes de expressão de acordo com uma das reivindicações 1 a 6.

23. SEMENTE GENETICAMENTE MODIFICADA, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de conter um ou mais cassetes de expressão de acordo com uma das reivindicações 1 a 6.

24. SEMENTE GENETICAMENTE MODIFICADA, de acordo com o método da reivindicação 13, caracterizada pelo fato de apresentar alteração na biossíntese da celulose, de hemiceluloses e/ou de ácidos

urônicos.

25. USO DA SEMENTE GENETICAMENTE MODIFICADA, de acordo com uma das reivindicações 22 ou 23, caracterizado pelo fato de ser para a geração de plantas.

5 26. MADEIRA, caracterizada pelo fato de ser obtida a partir da planta geneticamente modificada conforme uma das reivindicações 15 ou 16.

27. USO DA MADEIRA, proveniente da planta geneticamente modificada de acordo com uma das reivindicações 15 ou 16, caracterizado pelo fato de ser para construção civil, construção naval, fabricação de móveis e utensílios e produção de polpa celulósica e papel.

10 28. USO DA MADEIRA, de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de ser para a produção de polpa celulósica e papel.

29. CELULOSE, caracterizado pelo fato de ser obtida a partir da madeira conforme a reivindicação 26.

15 30. USO DA CELULOSE, proveniente da madeira de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de ser para a fabricação de papel.

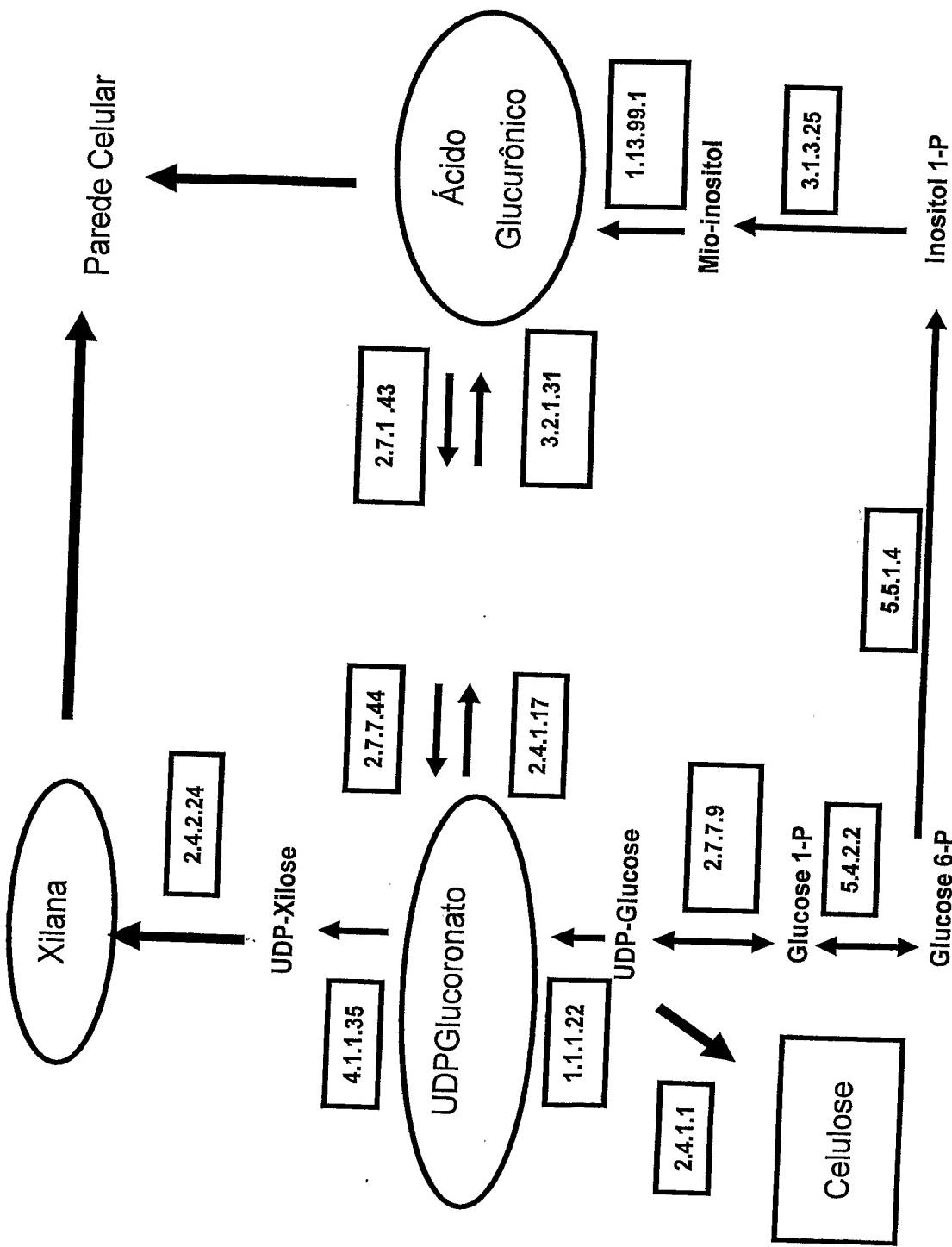
20 31. PAPEL, caracterizado pelo fato de ser obtido a partir da madeira ou da celulose conforme uma das reivindicações 26 ou 29, respectivamente.

32. USO DO PAPEL, proveniente da madeira ou da celulose conforme uma das reivindicações 26 e 29, respectivamente, caracterizado pelo fato de ser para construção civil, indústria de móveis, papel para impressão, embalagens e papel de absorção.

25 33. USO DO PAPEL, proveniente da madeira ou da celulose conforme uma das reivindicações 26 e 29, respectivamente, caracterizado pelo fato de ser como papel para impressão, embalagens e papel de absorção.

34. MÉTODO DE MODULAÇÃO DO NÍVEL DE

POLIPEPTÍDEOS EM PLANTAS, ditos polipeptídeos estando envolvidos na biossíntese das hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de: a) introdução na célula vegetal de um ou mais cassetes de expressão de genes de acordo com a reivindicação 1; b) 5 regeneração da célula vegetal; c) indução da expressão dos ditos polipeptídeos por tempo suficiente para modular o nível da biossíntese de hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos nas ditas plantas.

FIGURA 1

RESUMO

**"CASSETE DE EXPRESSÃO DE GENES, USO DE UM OU MAIS CASSETES
DE EXPRESSÃO DE GENES, MÉTODO DE TRANSFORMAÇÃO GENÉTICA
EM CÉLULAS VEGETAIS, MÉTODO DE OBTENÇÃO DE PLANTA
GENETICAMENTE MODIFICADA, PLANTAS GENETICAMENTE
MODIFICADAS, USO DA PLANTA, PLANTAS DERIVADAS, SEMENTES
GENETICAMENTE MODIFICADAS, USO DA SEMENTE GENETICAMENTE
MODIFICADA, MADEIRA, USO DA MADEIRA, CELULOSE, USO DA
CELULOSE, PAPEL, USO DO PAPEL E MÉTODO DE MODULAÇÃO DO
NÍVEL DE POLIPEPTÍDEOS EM PLANTAS"**

A presente invenção está relacionada a cassetes de expressão de genes que codificam enzimas envolvidas na rota metabólica da biossíntese das hemiceluloses, celulose e/ou ácidos urônicos, e ao método de transformação genética em células vegetais através da introdução de um ou mais cassetes de expressão de genes da presente invenção e superexpressão e repressão desses genes nas plantas.

Mais particularmente, a presente invenção refere-se a método de introdução de cassetes de expressão, em plantas. Adicionalmente, a presente invenção refere-se a plantas geneticamente modificadas.

A presente invenção trata também da obtenção da planta geneticamente modificada, suas plantas derivadas e sementes, bem como a madeira, papel e celulose proveniente dessa planta.